Verfolgung der Säurehydrolyse und der gleichlaufenden Drehungsänderung des Galaktomannan durch eine neue Methode der quantitativen Aldehydgruppenanfärbung

von

Bernd Mittendorf

aus Bad Sachsa

1962

1962 Nr 56

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität Erlangen-Nürnberg

Vorstand: Prof. Dr. med. et phil. F. May

Verfolgung der Säurehydrolyse und der gleichlaufenden Drehungsänderung des Galaktomannan durch eine neue Methode der quantitativen Aldehydgruppenanfärbung

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich-Alexander-Universität
zu
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von
Bernd M i t t e n d o r f
aus Bad Sachsa

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Referent: Priv.Doz. Dr. Dr. H. Weinland
Correferent: Professor Dr. Dr. F. May

Tag der mündlichen Prüfung: 22.Oktober 1962

Inhaltsverzeichnis

Einleitung und Problemstellung 4

I. Vororientierung 5

A) Zahl der papierchromatographisch faßbaren Hydrolysenspaltstücke 5

B) Charakterisierung der gewanderten Spaltstücke 6

II. Die quantitative Bestimmung der freien Aldehydgruppen der wandernden Hydrolysenspaltstücke.. 7

A) Die Baarsche Anilinphthalatfärbung für Glukose 7

B) Die Verbesserung der Baarschen Methode für den vorliegenden Zweck 7

1. Notwendige Sicherungsmaßnahmen 7

a) Auswahl des Papieres 7

b) Chromatographie auf Streifen 8

c) Markierung der Startstelle 8

d) Besondere Berücksichtigung der Fließmittelsättigung in der Chromatographiekammer 8

e) Anfärbung der Zuckerzonen 9

f) Farbelution und Photometrische Messung. 11

2. Verwendbarkeit der Methode für Mannose und Galaktose 11

3. Verwendbarkeit der Methode für Di- und Trisaccharide 12

III. Verlauf der Säurehydrolyse der Galaktomannan-Spaltstücke 13

A) Verfolgung des Hydrolysenverlaufes der Zone III 13

B) Verfolgung des Hydrolysenverlaufes der Zone IV 16

C) Verfolgung des Hydrolysenverlaufes der Zone V 19

D) Zusammensetzung der Trisaccharidzone 23

E) Zusammenstellung der ermittelten Extinktionen für gleiche Konzentrationen der beiden Monosaccharide in freier Form und in Bindung als Di- und Trisaccharid 24

IV. Das Galaktomannan 25

A) Struktur des Galaktomannan 25

B) Einheitlichkeit des Galaktomannan 26

C) Bereitung der Stammlösung 26

D) Spezifische Drehung, Trockengewicht und Aschegehalt der Stammlösung 27

E) Durchführung der Hydrolyse in Abhängigkeit von der Zeit 27

F) Auswertung der Meßergebnisse 30

1. Freie Galaktose im Gegensatz zur Mannose sofort nach Hydrolysenbeginn nachweisbar 30

2. Reduktion aller spaltbaren Saccharide in Abhängigkeit von der Zeit 30

3. Bevorzugte Spaltung der α 1-6 Galaktosidbindungen im Galaktomannan 30

4. Zusammenhänge zwischen optischer Drehung und Öffnung der Bindungen im Galaktomannan 33

a) Berechnung der molaren Drehung von β 1-4 mannosidisch gebundener Mannose 33

b) Berechnung der spezifischen Drehung des Mannose-Di- und Trisaccharides ... 36

c) Rechnerische Erfassung der Drehungsänderung während der Hydrolyse aus Art und Anzahl der gespaltenen Bindungen 37

5. Quantitative Photometrierung der Oligosaccharidzonen in Abhängigkeit von der Zeit nach Anfärbung direkt auf dem Papier 40

a) Methode für besonders kleine Substanzmengen 40

b) Eichung durch Vergleich mit Elutionsmethode 41

c) Messung der Oligosaccharide während des Hydrolysenverlaufes 45

6. Berechnung der Konzentrations- und mittleren Molekülgrößenänderung der Saccharide der Startzone in Abhängigkeit von der Zeit 46

Verfolgung der Säurehydrolyse und der gleichlaufenden Drehungsänderung des Galaktomannan durch eine neue Methode der quantitativen Aldehydgruppenanfärbung.

Einleitung und Problemstellung.

Bei der Säurehydrolyse des Galaktogens (1) wurde festgestellt, daß die L-Galaktose schneller vom Polysaccaridmolekül abgespalten wird als die D-Galaktose und angenommen, daß der Abbau gesetzmäßig verläuft, derart, daß ein Fließgleichgewicht zwischen den einzelnen kleineren Spaltstücken angestrebt wird.

Im Folgenden soll geprüft werden, ob bei der Säurehydrolyse des Galaktomannan, einem Polysaccarid, das aus D-Galaktose und D-Mannose (im Verhältnis 4:5) aufgebaut ist, sich auch ähnliche Gesetzmäßigkeiten feststellen lassen.

Das Galaktomannan ist für diese Untersuchung besonders gut geeignet, da sein einfacher Molekülaufbau* der Fragestellung entgegenkommt insofern, als seine Säurehydrolyse relativ wenige und leicht übersichtliche Zwischenprodukte erwarten ließ, was die Voruntersuchung bestätigte.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, von diesen zwischenzeitlichen Hydrolysenspaltstücken möglichst viele zu verschiedenen Zeiten der Hydrolyse quantitativ zu erfassen. Da die Zwischenprodukte immer in geringen Konzentrationen auftreten, mußten die Methoden zu deren Erfassung erst ausgearbeitet werden.

* Strukturformel S. 35

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536528_0130

I. Vororientierung.

A. Zahl der papierchromatographisch faßbaren Hydrolysenspaltstücke.

Galaktomannan aus Luzernensamen (2) wurde 2 Stunden mit n/5 H_2SO_4 in einem siedenden Wasserbad hydrolisiert und die Spaltung papierchromatographisch verfolgt. Bei der papierchromatographischen Trennung mit Butanol-Pyridin-Wasser als Fließmittel waren nach Anfärbung mit Anilinhydrogenphthalat neben den im Start verbliebenen Poly- bzw. Oligosacchariden ab 60 Minuten ständig noch fünf Zonen mit konstanten R_f-Werten nachweisbar.

Benennung der Zonen:

Die Zone mit dem größten R_f wurde Zone I genannt, die folgende Zone II usw. Die Zone I enthielt nur Mannose, die Zone II nur Galaktose.

Bild 1

Henderson, Hough und Painter (3) haben aus einer Hydrolysenlösung ihres Galaktomannan Säulenchromatographisch vier Oligosaccharide isolieren und bestimmen können.

1. Mannosido-Mannose
2. Galaktosido-Mannose
3. Mannosido-Mannosido-Mannose
4. Galaktosido-Mannosido-Mannose

Henderson (3) gibt an, daß es ihm nicht gelang, die beiden Trisaccharide (3 und 4) papierchromatographisch zu trennen.

B. Charakterisierung der gewanderten Spaltstücke.

Partiell hydrolysiertes Galaktomannan wurde neutralisiert und papierchromatographisch getrennt. Aus den großen Papierbögen wurden in bestimmten Abständen numerierte Suchstreifen ausgeschnitten, bei diesen die Saccharidzonen angefärbt, die Suchstreifen wieder entsprechend eingelegt und die nicht angefärbten Saccharidzonen markiert und ausgeschnitten, sodann mit Wasser extrahiert. Die wässrigen Saccharidlösungen wurden im Vakuum bei 60°C eingeengt. Jede Oligosaccharidzone wurde papierchromatographisch erneut getrennt und so ihre Einheitlichkeit gesichert.

Totalhydrolysen der einzelnen Zonen ergaben, daß die Zone III nur Mannose lieferte, die Zone IV Galaktose und Mannose zu gleichen Teilen, die Zone V Galaktose und Mannose im angenäherten Verhältnis von 1:4.

Aus der Zusammensetzung (Papierchromatographie nach Hydrolyse) und dem R_f-Wert der Oligosaccharidzonen wurde geschlossen, daß es sich bei der Zone III um Mannosido-Mannose, bei der Zone IV um Galaktosido-Mannose, der Zone V um ein Gemisch aus Galaktosido-Mannosido-Mannose und Mannosido-Mannosido-Mannose handelt. Die Trisaccharide (Zone V) sind in Übereinstimmung mit den Untersuchungen von Henderson (3) auch hier nicht papierchromatographisch trennbar.

II. Die quantitative Bestimmung der freien Aldehydgruppen der wandernden Hydrolysenspaltstücke.

A. Die Baarsche Anilinphthalatfärbung für Glukose.

S. Baar (4) gibt eine Eluierungsmethode zur quantitativen Bestimmung speziell der Glukose aus Ablagerungen auf Papierchromatogrammen an. Eine ähnliche Methode wurde von J.W. Date (5) zur quantitativen Bestimmung von Glukose, Galaktose, Laktose, Xylose und Arabinose auf Papierchromatogrammen beschrieben.
Prinzip: Nach der papierchromatographischen Trennung wird die Aldehydgruppe der Saccharide mit Anilinhydrogenphthalat auf dem Chromatogramm angefärbt und nach Ausschneidung eluiert. Mit zunehmender Molekülgröße ist die Zahl der Aldehydgruppen für gleiche Gewichte geringer, wodurch der Farbwert pro Gewichtseinheit weniger intensiv ist.

B. Verbesserung der Baarschen Methode für den vorliegenden Zweck.

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, daß die Methode von S. Baar (4) in abgeänderter Form für die Bestimmung von Galaktose, Mannose und die reduzierenden Oligosaccharide aus der Galaktomannanhydrolyse geeignet ist.

1. Notwendige Sicherungsmaßnahmen.

a) Auswahl des Papieres: In Vorversuchen wurde festgestellt, daß die Chromatographiepapiere Whatman Nr.4, Binzer Nr.202, Schleicher & Schüll Nr.2043a und 2043b verwendbar sind. Es ist zu beachten, daß die Extinktionen für gleiche Zuckerkonzentrationen bei unterschiedlichen Papieren nach Eluierung nicht gleich sind. Im allgemeinen sind dickere Chromatographiepapiere (z.B. Schleicher & Schüll 2043b) besser für quantitative Bestimmungen geeignet ~~sind~~, da die Schwankungen in der Papierdicke bei dünnen Papieren bisher noch immer größer sind.

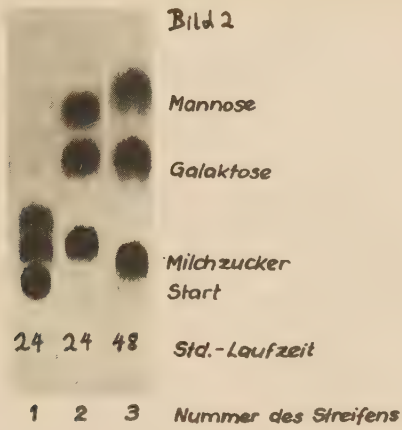
Für die Versuche dieser Arbeit wurden nur Schleicher& Schüll Chromatographiepapiere 2043b verwendet.

b) Chromatographie auf Streifen: Um ein seitliches Verlaufen oder gar ein Ineinanderlaufen der Saccharidzonen von banachbarten Auftragungen zu verhindern, wurde bei quantitativen Bestimmungen ausschließlich auf 3 oder 4 cm breiten Streifen chromatographiert; je Streifen eine Startstelle.

c) Markierung der Startstelle: Um eine mögliche Verletzung der Papierstruktur auszuschließen, wurde nur rechts und links der Startstelle eine Markierung angebracht. Dadurch entfällt jede Beeinflussung der Auftragung.

d) Besondere Berücksichtigung der Fließmittelsättigung in der Chromatographiekammer: Als Fließmittel diente Butanol-Pyridin-Wasser (30:20:15). Es wurde absteigend in einem gläsernen Batteriekasten (20x25x60cm) chromatographiert. Die Trennschärfe und die Geschwindigkeit der Trennung ist stark von der Sättigung im Chromatographiekasten abhängig. Um eine saubere Trennung zu erhalten, muß man ein Gefäß mit möglichst kleinen Volumen wählen und sowohl den Trog,in dem die Chromatographiestreifen hängen als auch den Boden des Kastens mit Fließmittel beschicken. Außerdem werden an allen Wänden des Chromatographiekastens mit Fließmittel getränkte Filterpapiere so befestigt, daß sie in das auf dem Boden des Gefäßes befindliche Fließmittel eintauchen. Dadurch wird eine maximale Sättigung erreicht, die Laufzeit der Chromatogramme wesentlich verkürzt und die Diffusion der Saccharidzonen stark herabgesetzt. Diese Schutzmaßnahme der Totalsättigung spielt weniger eine Rolle bei der Einstellung der richtigen R_f-Werte der Monosaccharide, ist aber für das schnellere Erreichen der R_f-Werte von Di- und Oligosacchariden bedeutungsvoll; da diese größeren Moleküle offensichtlich erst bei Vollsättigung gegenüber den kleineren ein bestimmtes Geschwindigkeitsverhältnis beibehalten.

Ein Beispiel mit Milchzucker möge die Verhältnisse demonstrieren.



Bei Streifen 1 und 3 Sättigung des Chromatographiekastens nur durch das auf dem Boden stehende Fließmittel.
Bei Streifen 2 zusätzliche Sättigung durch lösungsmittelgetränkte Filterpapiere an den Wänden des Chromatographiekastens.

1) Nach 24 Stunden Trennung unvollständig (gegenüber den 24 Stundenstreifen 2 bei Vollsättigung). Die R_f-Werte können bei 1 nicht bestimmt werden, während sie bei 2 richtig liegen.
3) Nach 48 Stunden ist zwar eine gute Trennung erreicht, im Vergleich mit einer Messung mit Vollsättigung (2) bleibt aber die Milchzuckerablagerung in ihrem R_f-Wert deutlich zurück und hat bei 2 einen höheren Stand in der halben Zeit erreicht.

e) Anfärbung der Zuckerzonen; Berücksichtigung der Färbemittelkonzentration.

Zur Anfärbung der Zuckerzonen diente eine 3%ige Anilinhydrogenphthalatlösung (Lösungsmittel: 85 Vol. n-Propylalkohol + 15 Vol. Wasser). Bei S. Baar (4) ist die Konzentration an Anilin und Phthalsäure geringer, sie entspricht nur ungefähr einer 2,3%igen Anilinhydrogenphthalatlösung. Für die vorliegenden Untersuchungen erschien trotz der geringen Saccharidmengen eine

Erhöhung der Konzentration an Anilinhydrogenphthalat günstig zu sein, da Vorversuche ergeben hatten, daß so der Bereich des linearen Verlaufs der Eichkurven erweitert werden konnte. Diese Frage ist besonders wichtig bei der ansteigenden Aldehydkonzentration der Totalhydrolysen,

Durchführung der Färbung: Die luftgetrockneten Chromatographiestreifen werden in einer flachen Schale durch Anilinhydrogenphthalatlösung gezogen. Das überschüssige Reagenz wird nach etwa 10 Sek. mit einer "Fitro" Abstreifzange (im Fotohandel erhältlich) entfernt (abgestreift).

Die Streifen trocknen hängend auf einem Gestell 30-60 Minuten bei Zimmertemperatur. Dann werden die Chromatographiestreifen auf einem Filterbogen nebeneinandergelegt, mit einem zweiten Filtrierpapierbogen bedeckt und mit einem federnden Kupferblech auf ganzer Breite fest gegen die temperaturkonstante (115°C) Wand eines kupfernen Einsatzbehältersdes Höppler Thermostaten gedrückt. Dieser wird mit einem Deckel verschlossen, die Streifen werden 15 Minuten bei 115°C gehalten.

So ist es möglich, die von S.Baar angegebene Temperatur von 115$\pm$1°C exakt einzuhalten, was notwendig ist, da die Extinktionen sehr stark von der Entwicklungstemperatur und der Entwicklungszeit abhängig sind. In den üblichen Brut- und Entwicklungsschränken war es nicht möglich, die erforderliche Temperaturkonstanz sofort zu erreichen. In diesen Schränken wird die Wärme durch den Luftstrom übertragen. Bei der Beschickung muß zwangsläufig eine Temperaturschwankung im Schrank auftreten, die erst nach ungefähr 5-10 Minuten wieder ausgeglichen ist.

Im Ultrathermostaten dagegen wird der kupferne Einsatzbehälter durch ein Glyzerinbad erwärmt und ein Temperaturabfall, der auch hier beim Einbringen der Streifen auftritt, wird durch eine unmittelbare Wärmeübertragung sehr schnell wieder ausgeglichen.

f) Farbelution und Photometrische Messung: Die angefärbten Saccharidzonen und von jedem Streifen ein Papierleerwert gleicher Breite wurden mit einem Schneidgerät (zwei Rasierklingen, parallel in fixiertem Abstand gehalten) ausgeschnitten.

Jede dieser Zonen wurde in einem Reagenzglas (10 mm Ø, 100 mm lang) das 4ccm 0,7 N HCL in 80%igem Äthylalkohol enthält (6) 24 Stunden im Dunkeln extrahiert (Verschluß der Reagenzgläser mit Kunststoffverschlüssen). Herstellung der Extraktionslösung: 420 ccm Äthylalkohol 95% + 29 ccm Salzsäure 36% mit Wasser auf 500 ccm auffüllen. Vor der Messung müssen die Reagenzgläser geschüttelt werden.

Die Extinktion dieser Lösungen wurde bei 390 mμ im Beckmann Spektralphotometer Modell D.U. gemessen. Schichtdicke 1 cm.

2. Verwendbarkeit der Methode für Mannose und Galaktose.

Die Verwendbarkeit der Methode für Monosaccharide wurde mit Zuckergemischen (Galaktose und Mannose im gleichen Verhältnis) steigender Konzentration [8; 20; 40; 64; 120; und 200 γ je Zucker und Auftragung (10 cmm)] geprüft. Die Extinktion der Eluate der angefärbten Galaktose und Mannosezonen waren den aufgetragenen Saccharidmengen proportional. In dem untersuchten Bereich erübrigt sich die Aufstellung einer Eichkurve wegen der Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes. Zur Eichung wurden in jedem Analysengang 3 bis 5 Chromatographiestreifen mit Vergleichslösungen (150 γ Galaktose 150 γ Mannose je Chromatographiestreifen) mit ausgemessen.

3. Verwendbarkeit der Methode für Di- und Trisaccharide.

Nach der oben angegebenen Methode kann man auch die Oligosacchadridzonen der partiellen Galaktomannan-Hydrolyse quantitativ bestimmen, da jedes Oligo-Saccharid eine freie Aldehydgruppe hat. Es wurden 10, 15, 20, 30 cmm einer 2 Stunden-Hydrolyse von Galaktomannan in $\frac{n}{5}$ H_2 SO_4 in Mehrfachauftragungen nach Zwischentrocknung, wie oben beschrieben chromatographiert, gefärbt und eluiert. Die Extinktionen der ausgemessenen Oligosaccharidzonen waren den aufgetragenen Saccharidkonzentrationen proportional. In dem untersuchten Bereich erübrigt sich die Aufstellung einer Eichkurve wegen Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes.

Die Oligosaccharide, die hier untersucht werden, sind im Handel nicht erhältlich. Zur Eichung der Extinktionen der eluierten Farbzonen wurden deshalb geringe Mengen der Oligosaccharide, durch Eluierung aus Papierchromatogrammen isoliert, einzeln untersucht. Sie zu wiegen war nicht möglich. Um über die Konzentration der Oligosaccharide etwas aussagen zu können, wäre der einfachste Weg der, jedes Zwischenprodukt (der Di- und Oligosaccharide) einer Totalhydrolyse zu unterwerfen und die Extinktionen der Totalhydrolyse (Hexosen) nach jeweiligem Chromatographieren zu messen. Die entstandenen Monosaccharide erlauben dann einen Rückschluß auf die Menge des jeweils vorgelegenen Oligosaccharides.

Bei den folgenden Versuchen wurde zusätzlich die Aufspaltung in Abhängigkeit von der Zeit mitgemessen, um später über die Art der Reaktion etwas aussagen zu können.

III. Verlauf der Säurehydrolyse der Galaktomannan-Spaltstücke.

A. Verfolgung des Hydrolysenverlaufes der Zone III (Mannosido-Mannose)

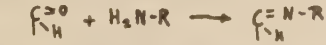
200 cmm der Disaccharidlösung wurden mit 200 cmm 0,4n H_2SO_4 vereinigt und gut durchmischt. In verschmolzenen Glaskapillaren wurden je 60 cmm der Lösung bei 100°C (Glyzerinbad) im Hoeppler-Thermostaten invertiert.

Nach verschiedenen Zeiten wurde je eine Kapillare dem Thermostaten entnommen und sofort abgekühlt. Je 10 cmm wurden mit einer Konstriktionspipette auf 60 cm lange und 4 cm breite Chromatographiestreifen Schleicher & Schüll 2043b aufgetragen und wie Seite 7 bis 11 beschrieben getrennt, gefärbt und eluiert.

Gemessen wurden die Extinktionen der Eluate der beiden aufgetretenen Zonen: (Zone I = abgespaltene Mannose, Zone III = noch nicht gespaltenes Disaccharid, Tabelle 1, Lfd.Nr. 1 und 2).

Multipliziert man die Extinktion des Disaccharids einer Hydrolysenzeit mit 2 und addiert die entsprechende Extinktion der schon als Monosaccharid vorliegenden Mannose, so entspricht diese errechnete Extinktion der Extinktion der Totalhydrolyse (Tabelle 1, Lfd.Nr.3). Die maximale Abweichung der berechneten Extinktion von der Extinktion der Totalhydrolyse beträgt 6%. Der Quotient: $\frac{\text{Extinktion Totalhydrolyse}}{\text{Berechnete Ext.d.Gesamtmannose}}$ (Tabelle 1, Lfd.Nr. 5) bewegt sich zwischen 1,06 und 0,97.

Bei der hier angewandten Methode reagieren nur die freien Aldehygruppen der Saccharide, wahrscheinlich im Sinne der Bildung einer Schiffschen Base (7):



Die Molekülgröße der hier untersuchten Saccharide hat keinen sichtbaren Einfluß auf die gemessenen Extinktionen.

Hydrolysenverlauf der Zone III (Mannosido-Mannose) — Tabelle 1

Lfd. Nr.		Werte gewonnen durch:	Zeit in Stunden 1	2	4	6	24
1	Extinktion Mannose	Messung	0,240	0,408	0,607	0,688	0,836
2	Extinktion Mannosido-Mannose	Messung	0,274	0,221	0,121	0,070	0,00
3	Extinktion Mannose + 2x Mannosido-Mannose	Rechnung	0,789	0,851	0,849	0,831	0,836
4	Differenz gegen Totalhydrolyse	Rechnung	-0,047	+0,015	+0,013	-0,005	–
5	Extinktion Totalhydrolyse / Berechnete Ext. d. Gesamtmannose	Rechnung	1,06	0,98	0,97	1,01	–
6	Freie Mannose in mg %	Extinktion Lfd. Nr. 1 x 1000 / Ext. pro 1g% Mannose (0,478)	503	854	1270	1440	1750
7	Als Mannosido-Mannose noch gebundene Mannose in mg %	Subtraktion d. freien Mannose von der Totalhydrolyse	1247	896	480	310	0
8	Extinktion pro 1g% Mannose gebunden als Mannosido-Mannose	Extinktion Lfd. Nr. 2 x 1000 / Konzentration Lfd. Nr. 7 in mg %	0,220	0,247	0,252	0,226	

Berechnung der Konzentration der freien Mannose.
Zur Umrechnung der Extinktionen der Mannose in mg% wurden Teststreifen mit bekannter Mannosekonzentration benutzt (titriert nach Fehling-Lehmann-Schoorl 8). Die Auftragungen der Testsubstanzen und der Analysen wurden immer mit der gleichen Konstriktionspipette (10 cmm) vorgenommen.

Konzentration der Mannosetestlösung titriert nach Fehling-Lehmann-Schoorl 1,445g%, gemessene Extinktion des Teststreifens 0,691. Einer Mannosekonzentration von 1g% entspricht somit wegen Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes die Extinktion 0,478.

Dividiert man die Mannoseextinktionen (Tabelle 1, Lfd.Nr. 1) durch 0,478, so erhält man die Mannosekonzentration in g%.

Berechnung der Mannosido-Mannosekonzentrationen.
Subtrahiert man von der Monosaccharidkonzentration der Totalhydrolyse (1750 mg%) die zu den einzelnen Zeitabschnitten der Hydrolyse von freigesetzten Monosaccharide (Tabelle 1, Lfd.Nr. 6), so erhält man die Konzentration der Mannose, die im Disaccharid des entsprechenden Zeitabschnittes noch gebunden ist. (Tabelle 1, Lfd.Nr. 7).

Extinktion pro 1g% Mannose gebunden als Mannosido-Mannose verglichen mit Extinktion pro 1 g% freie Mannose. Dividiert man die Extinktion der Mannosido-Mannose zu verschiedenen Zeiten (Tabelle 1,Lfd.Nr.2) durch die entsprechenden Konzentration der noch als Mannosido-Mannose gebundenen Mannose in g% (Tabelle 1, Lfd.Nr.7), so erhält man jeweils die Extinktion pro 1 g% Mannose gebunden als Mannosido-Mannose (Tabelle 1, Lfd.Nr. 8). Aus diesen Werten ergibt sich ein Mittelwert von 0,236, d.h. einer Mannosekonzentration von 1 g% gebunden als Mannosido-Mannose entspricht eine Extinktion von 0,236.

Die Extinktion 0,236 pro 1 g% Mannose gebunden als Mannosido-Mannose wird im folgenden zur Umrechnung jeder Extinktion von Mannosido-Mannose auf Konzentration der darin gebundenen Mannose verwendet. Die Extinktion von 1 g% in Form von Disaccharid gebundener Mannose ist mit 0,236 gegenüber der Extinktion von 1 g% freier Mannose mit 0,478 halb so groß, mit einer Annäherung von 1,6%, was zeigt, daß die Anfärbung allein die Aldehydgruppen betrifft und der Zahl der Aldehydgruppen proportional ist.

B. Verfolgung des Hydrolysenverlaufes der Zone IV (Galaktosido-Mannose)

Bei Verfolgung des Hydrolysenverlaufs der Zone IV wurde analog wie bei Zone III vorgegangen. Die Ergebnisse wurden in der Tabelle 2 zusammengestellt. Wie Tabelle 2, Lfd.Nr. 4, 5 und 6 zeigt, ist es auch in diesem Fall möglich, aus einer partiellen Hydrolyse die Extinktion der Mannose der Totalhydrolyse zu berechnen (hier Extinktion freie Mannose plus Extinktion des Disaccharids der gleichen Zeit). Die Abweichung von der Mannoseextinktion der Totalhydrolyse beträgt bei Hydrolysenbeginn 11%, später nur noch 5,3%. Verglichen mit dem Disaccharid β 1-4 Mannosido-Mannose hat es den Anschein, daß die α 1-6 gebundene D-Galaktose die Farbintensität des reduzierenden Mannoserestes schwächt, da die berechnete Extinktion der Gesamtmannose (Tabelle 2, Lfd.Nr.4) stets geringer ist als die Extinktion der Mannose der Totalhydrolyse (24 Stunden). Der Quotient:

$$\frac{\text{Extinktion d.Mannose d.Totalhydrolyse}}{\text{berechnete Extinktion d.Gesamtmannose}}$$

sinkt von 1,12 auf 1,06.

Aus den Extinktionsmessungen von Teststreifen mit bekannter Mannose und Galaktosekonzentration wurde für diese Hydrolyse berechnet, daß

der Mannosekonzentration von 1 g% die Extinktion 0,483 der Galaktosekonzentration von 1 g% die Extinktion 0,571 entspricht. Die Extinktion für 1 g% Galaktose in 10cmm Analysenlösung liegt somit um 18% höher als die für 1 g% Mannose.

Einer Hexosekonzentration von 1 g% gebunden als Galaktosido-Mannose entspricht eine Extinktion von 0,225 (Mittelwert der Tabelle 2, Lfd.Nr.10).

Die Extinktion des Disaccharids ist gegenüber der Extinktion für freie Mannose von 0,483 halb so groß mit einer Annäherung von 6,8%.

Hydrolysenverlauf der Zone IV (Galaktosido-Mannose)

Tabelle 2

Lfd. Nr.		Werte gewonnen durch:	Zeit in Stunden 0,5	1	2	24
1	Extinktion Mannose	Messung	0,037	0,067	0,110	0,262
2	Extinktion Galaktose	Messung	0,045	0,079	0,135	0,299
3	Extinktion Galaktosido-Mannose	Messung	0,197	0,181	0,138	0,000
4	Extinktion Mannose + Extinktion Disaccharid	Rechnung	0,234	0,248	0,248	0,262
5	Differenz (der Lfd. Nr. 4) gegen Mannose der Totalhydrolyse	Rechnung	-0,028	-0,014	-0,014	–
6	Extinktion d. Mannose d. Totalhydrolyse / berechnete Ext. d. Gesamtmannose	Rechnung	1,12	1,06	1,06	–
7	Freie Mannose mg%	Extinktion Lfd. Nr. 1 x 1000 / Ext. pro 1g% Mannose (0,483)	77	139	228	543
8	Freie Galaktose mg%	Extinktion Lfd. Nr. 2 x 1000 / Ext. pro 1g% Galaktose (0,571)	79	138	236	523
9	Als Galaktosido-Mannose noch gebundene Hexose mg%	Subtraktion d. freien Hexose von der Totalhydrolyse	910	790	602	0
10	Extinktion pro 1g% Hexosegemisch gebunden als Galaktosido-Mannose	Extinktion Lfd. Nr. 3 x 1000 / Konzentration Lfd. Nr. 9 in mg%	0,216	0,229	0,229	–

C. Verfolgung des Hydrolysenverlaufs der Zone V

(Mannosido-Mannosido-Mannose und
Galaktosido-Mannosido-Mannose)

Die Bedingungen, unter denen die Hydrolysen durchgeführt wurden, waren die gleichen wie für Zone III und IV.

Nach Chromatographie und Anfärbung der Saccharidzonen wurden die Extinktionen der Eluate der Zone I, II (Monosaccharide) während der Hydrolyse gebildet, der Zonen III und IV (Disaccharide) während der Hydrolyse vorübergehend auftretend, der Zone V (noch nicht gespaltenes Trisaccharidgemisch) gemessen. Die Ergebnisse wurden in der Tabelle 3 zusammengestellt.

Berechnung der Saccharidkonzentrationen:
Aus den Extinktionsmessungen von Teststreifen mit bekannter Mannose- und Galaktosekonzentration wurde bei dieser Hydrolyse berechnet, daß der Mannosekonzentration von 1 g% die Extinktion 0,459 der Galaktosekonzentration von 1 g% die Extinktion 0,540 entspricht. Die Extinktionen der Zone III und IV wurden mit Hilfe der Extinktionen für 1 g% Hexose gebunden als Mannosido-Mannose (Seite 15 = 0,236) und 1 g% Hexose gebunden als Galaktosido-Mannose (Seite 17 = 0,225) in mg% gebundene Hexose im Disaccharid umgerechnet.

Berechnung der Saccharidkonzentration der Zone V:
Subtrahiert man die Summe der Saccharidmengen der Zonen I, II, III und IV einer Hydrolysenzeit von der Gesamtmenge der Hexosen der 24 Stunden-Hydrolyse, so erhält man die Saccharidmenge der Zone V der entsprechenden Zeit (Tabelle 3, Lfd.Nr.10).

Berechnung der Extinktion von 1 g% Hexose gebunden im Trisaccharidgemisch der Zone V:
Dividiert man die Extinktion des Trisaccharidgemisches (Tabelle 3, Lfd.Nr.5) durch die Hexosengemischkonzentration in g%, die in diesem gebunden ist

(Tabelle 3, Lfd.Nr. 10) der gleichen Hydrolysenzeit) so erhält man die Extinktion pro 1 g% Hexosengemisch gebunden als Mannosido-Mannosido-Mannose und Galaktosido-Mannosido-Mannose (Tabelle 3, Lfd.Nr.11).

Extinktion pro 1 g% Hexosengemisch gebunden im Trisaccharidgemisch als Mannosido-Mannosido-Mannose und Galaktosido-Mannosido-Mannose = 1,54 (Mittelwert der Tabelle 3, Lfd.Nr.11).

Die Extinktion des Trisaccharidgemisches beträgt nur 1/3 der Extinktion für 1 g% freie Mannose von 0,459 mit einer Annäherung von 0,7%.

Bei der Verfolgung der Hydrolyse der Zone V war es nicht möglich, in gleicher Weise wie bei den Hydrolysen der Zone II und IV, die Extinktionen der Gesamtmannose der Totalhydrolyse jeweils durch einfache Multiplikationen und Additionen der partiellen Hydrolysen zu berechnen, da der Gehalt an Mannose in den beiden Trisacchariden, aus denen die Zone V besteht, unterschiedlich ist. Das eine Trisaccharid enthält Galaktose, deren Extinktion sich von der Mannoseextinktion unterscheidet (Seite 17 und 19).

Doch ergibt auch hier die Extinktion der beiden vorliegenden Disaccharide zu verschiedenen Zeiten multipliziert mit 2 und dividiert durch die Extinktion für 1 g% Mannose die Konzentration an Hexosen, die in den Disacchariden gebunden sind und ebenso die Extinktion des Trisaccharidgemisches multipliziert mit 3 und dividiert durch die Extinktion für 1 g% Mannose die Konzentration an Hexosen, die im Trisaccharid zu den verschiedenen Zeiten gebunden sind. Auf Vorlage einer entsprechenden Tabelle wird verzichtet.

Hydrolysenverlauf der Zone V (Mannosido-Mannosido-Mannose + Galaktosido-Mannosido-Mannose)

Tabelle 3

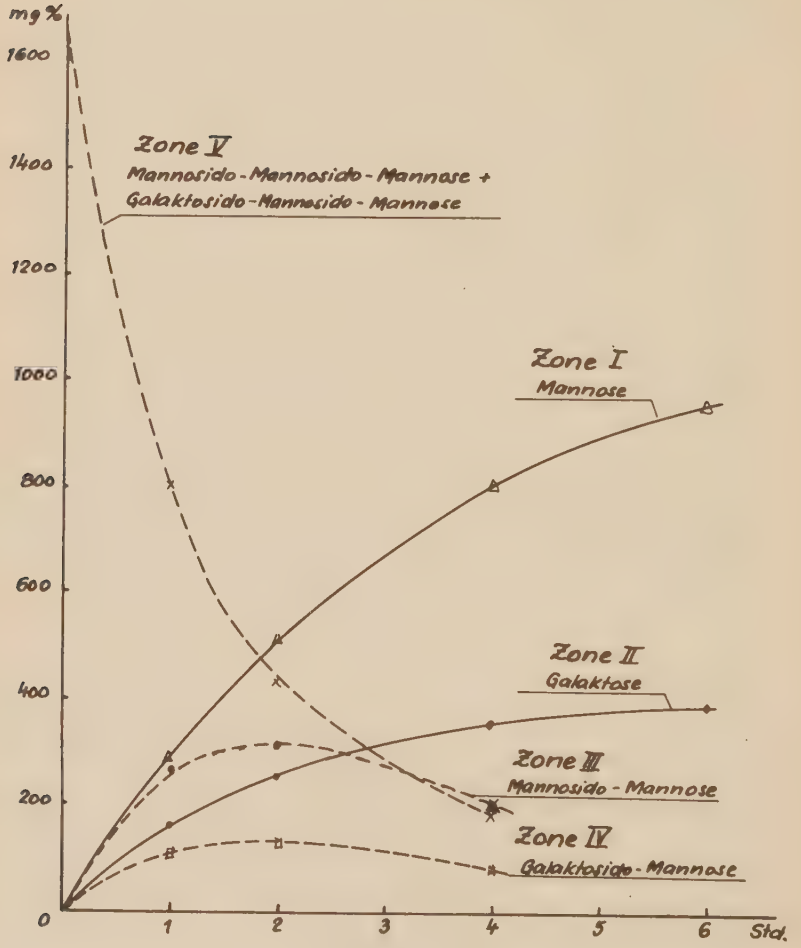
Lfd. Nr.		Werte gewonnen durch:	Zeit in Stunden 1	2	4	6	24
1	Extinktion Mannose	Messung	0,131	0,237	0,371	0,436	0,550
2	Extinktion Galaktose	Messung	0,087	0,136	0,189	0,208	0,231
3	Extinktion Mannosido-Mannose	Messung	0,064	0,072	0,047	*	0
4	Extinktion Galaktosido-Mannose	Messung	0,024	0,028	0,018	*	0
5	Extinktion Mannosido-Mannosido-Mannose + Galaktosido-Mannosido-Mannose	Messung	0,114	0,071	0,029	*	0
6	Freie Mannose mg %	Extinktion Lfd. Nr. 1 x 1000 / Extinktion für 1% Mannose (0,459)	286	516	809	950	1200
7	Freie Galaktose mg %	Extinktion Lfd. Nr. 2 x 1000 / Extinktion für 1% Galaktose (0,540)	161	252	350	385	427
8	Als Mannosido-Mannose noch gebundene Mannose mg %	Extinktion Lfd. Nr. 3 x 1000 / Ext. für 1% Mannose geb. als Mannosido Mannose (0,836)	272	306	200	–	0
9	Als Galaktosido-Mannose noch gebundenes Hexosengemisch mg %	Extinktion Lfd. Nr. 4 x 1000 / Ext. für 1% Hexosengemisch geb. als Galaktosido-Mannose (0,215)	107	125	80	–	0
10	Hexosengemisch mg % gebunden als Mannosido-Mannosido-Mannose und Galaktosido-Mannosido-Mannose	Subtraktion d. Saccharide der Zonen I bis IV von der Totalhydrolyse	801	428	188	–	0
11	Extinktion pro 1 g % Hexosengemisch geb. als Mannosido-Mannosido-Mannose und Galaktosido-Mannosido-Mannose	Extinktion Lfd. Nr. 5 x 1000 / Konzentration Lfd. Nr. 10 in mg %	0,142	0,166	0,154	–	–

* Extinktion konnte wegen zu geringer Farbkonzentration nicht gemessen werden

Hydrolysenverlauf der Zone V

Abb. 1

Konzentrationsänderung der Ausgangssubstanz und der Spaltprodukte



D. Zusammensetzung der Trisaccharidzone.

Die Totalhydrolyse (24 Stunden) enthielt 427 mg% Galaktose und 1200 mg% Mannose (Tabelle 3,Seite 21). Daraus ergibt sich, daß 427 x 2 mg% der Mannose aus der Galaktosido-Mannosido-Mannose freigesetzt wurden. Der Rest der Mannose 1200 - 427 x 2 = 346 mg% stammt aus der Mannosido-Mannose. Die Ausgangslösung enthielt also 1281 mg% der Monosaccharide in Form von Galaktosido-Mannosido-Mannose, entsprechend 1196 mg% Trisaccharid und 346 mg% der Monosaccharide als Mannosido-Mannosido-Mannose,entsprechend 323 mg% Trisaccharid.

Damit enthielt die Zone V

21% Mannosido-Mannosido-Mannose
79% Galaktosido-Mannosido-Mannose.

E. Zusammenstellung der ermittelten Extinktionen für gleiche Konzentrationen (1%) der beiden Monosaccharide in freier Form und in Bindung als Di- und Trisaccharid.

Bei allen diesen bisherigen Untersuchungen wurden von den Testlösungen und den Analysenlösungen jeweils 10 cmm für jede Papierchromatographie verwendet.

Extinktion für 1 g% Mannose:

0,478	Seite 15	Hydrolyse der Zone III
0,483	Seite 17	Hydrolyse der Zone IV
0,459	Seite 19	Hydrolyse der Zone V
0,473	= Mittelwert	

Extinktion für 1 g% Galaktose:

0,571	Seite 17	Hydrolyse der Zone IV
0,540	Seite 19	Hydrolyse der Zone V
0,555	= Mittelwert	

Extinktion für 1 g% Mannose gebunden als Mannosido-Mannose:

0,236	Seite 15	Hydrolyse der Zone III

Extinktion für 1 g% Hexosengemisch gebunden als Galaktosido-Mannose:

0,225	Seite 17	Hydrolyse der Zone IV

Extinktion für 1 g% Hexosengemisch gebunden als Mannosido-Mannosido-Mannose und Galaktosido-Mannosido-Mannose:

0,154	Seite 20	Hydrolyse der Zone V

IV. Das Galaktomannan.

A. Struktur des Galaktomannan.

Nach bisher vorliegenden Arbeiten (E.B.Larson (10), M.E.Henderson (3), J.E.Coutois (11) und(12)) muß man den Galaktomannanen folgende Struktur zuerkennen.

Eine Hauptkette aus (1-4)β -d-Mannose an die pro Mannose eine (1-6)α -d-galaktosidisch gebundene Galaktose angehängt ist. Es können aber auch Mannoseglieder ohne Galaktose vorkommen.

Im vorliegenden Fall wurde das Verhältnis Mannose: Galaktose = 5:4 gemessen. Es sind auch andere Mengenverhältnisse nachgewiesen worden. (Maximal ist das Verhältnis Mannose:Galaktose = 1:1).

Aus der Struktur des Galaktomannan ergibt sich:

1) daß bei jeder Spaltung einer Galaktosidbindung eine Galaktose frei wird,

2) daß die reduzierenden Gruppen der Oligosaccharide nur Aldehydgruppen der Mannose sein können.

B. Einheitlichkeit des Galaktomannan.

Bei einem Sedimentationsversuch in der analytischen Ultrazentrifuge (Modell E der Firma Beckmann/Spinco) trat nur ein Gipfel auf (59.780 u/Min.). Es ließen sich keine Komponenten mit stark voneinander abweichenden Sedimentationskonstanten nachweisen. Es ist daher wahrscheinlich, daß das Galaktomannan hinsichtlich seiner Molekülgröße weitgehend einheitlich ist.

Das Polysaccharid erwies sich auch elektrophoretisch einheitlich (Veronal-Natriumacetat-Puffer pH 9,3, 220 V auf Papier Schleicher & Schüll 2043b und Seide (12).

C. Bereitung der Stammlösung.

0,6 g D-Galakto-D-Mannan aus Luzernensamen wurden mit 10 ccm Aqua dest. versetzt, wobei eine weitgehende Lösung des Polysaccharides erreicht wurde. Offensichtlich bedingt die Galaktose in der Seitenbindung eine bessere Löslichkeit des Galaktomannans. Ein Präparat mit Galaktose:Mannose = 1:1 löst sich leicht, während reine Mannane unlöslich sind. Anschließend wurde die Lösung, um eine vollkommen homogene Ausgangslösung für die Hydrolyse zu erhalten, 20 Minuten bei 4.000 U/Min. in einer Christ-Zentrifuge zentrifugiert.

Die überstehende Lösung ist die Galaktomannan-Stammlösung. Sie wurde bei -16°C im Tiefkühlfach gehalten.

D. Spezifische Drehung, Trockengewicht, Aschegehalt der Stammlösung.

496 cmm (Konstriktionspipette mit Quecksilber geeicht) der Galaktomannan-Stammlösung wurden bei 110°C im Trockenschrank eingedampft und dann bei 150°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.
Trockengewicht mit Asche = 27,3 mg.
Nach Veraschung im Muffelofen bei 600°C
Gewicht der Asche = 0,3 mg.
Der Gehalt der Stammlösung an Galaktomannan betrug 5,42% Asche frei.
Die optische Drehung der Stammlösung im 5 cm Rohr = + 2,32° ±0,02° (Mittelwert aus 10 Ablesungen).
Die Spezifische Drehung des Galaktomannan, bezogen auf aschefreie Substanz betrug 85,4°.

E. Durchführung der Hydrolyse in Abhängigkeit von der Zeit.

3 ccm Galaktomannan Stammlösung wurden mit 3 ccm 0,4n H_2SO_4 gut durchmischt, je 0,7 ccm der Hydrolysenlösung wurden in acht Hartglasampullen (Fassungsvermögen = 1,5 ccm) abgefüllt. Diese wurden zugeschmolzen und gemeinsam ein einem Drahtkorb in das Glyzerinbad von 100,0°C±0,01° im Höppler-Thermostaten eingesenkt. Nach 1; 2; 3; 4; 6; 8; 11 Stunden wurde je eine Ampulle dem Bad entnommen und sofort abgekühlt.

Messungen an den Hydrolysenlösungen.

1) Die optische Drehung der noch sauren Lösungen wurde im 5 cm Mikrorohr gemessen.

2) Zur Bestimmung der abgespaltenen Monosaccharide wurden von jeder noch sauren Hydrolyse je 10 cmm auf zehn 4 cm breite Streifen aufgetragen (Chromatographiepapier Schleicher & Schüll 2043b). Die Auswertung erfolgte wie oben beschrieben. Die Werte in der Tabelle 4 sind Mittelwerte aus diesen Auftragungen.

3) Neutralisation der Hydrolysenlösungen.

500 cmm jeder Hydrolysenlösung wurden mit je 500 cmm einer 0,2n NaOH neutralisiert (auf pH 7,0).

4) Messung der Gesamtreduktion der Hydrolyse mit Reduktionsmethode nach Macleod-Robison.(13)

Die zur Titration verwandten Mengen der neutralisierten Hydrolysenlösungen sind aus der Tabelle 4 zu ersehen. Jede Titration wurde dreifach gesichert.

5) Zur Papierchromatographischen Bestimmung der Di- und Tri- und Oligosaccharide ist deren Konzentration in der Galaktomannanhydrolyse für die Elutionsmethode zu gering. Deshalb wurde hierfür eine etwa dreimal so empfindliche Methode ausgearbeitet, die es erlaubt, die mit Anilinphthalat angefärbten Saccharidzonen direkt auf dem Chromatographiepapier (ohne Eluierung der Farbzonen) im Durchlicht zu messen. Für diese Methode wurden von jeder neutralisierten Hydrolyse je 20 cmm auf zehn 3 cm breite Chromatographiestreifen aufgetragen.

Alle Zahlenangaben in den folgenden Tabellen beziehen sich auf die Konzentration der sauren Hydrolysenlösung, d.h. wenn mit neutralisierten Lösungen gearbeitet werden mußte, wurde entsprechend die doppelte Menge an Lösungen verwendet.

Hydrolyse des Galaktomannans Abnahme der spezifischen Drehung, Zunahme d. freien Mannose, d. freien Galaktose und der Gesamtreduktion

Tabelle 4

Lfd. Nr.		Zeit in Stunden							
		0	1	2	3	4	6	8	11
1	Optische Drehung 5cm Rohr in Grad	1,16°	+0,87°	+0,74°	+0,64°	+0,64°	+0,60°	+0,62°	+0,61°
2	Chromatographische Bestimmung d. Monosaccharide in g%: Mannose	–	0,0	0,297	0,571	0,872	1,260	1,412	1,490
3	Chromatographische Bestimmung d. Monosaccharide in g%: Galaktose	–	0,444	0,760	0,945	1,081	1,179	1,192	1,217
4	Titration nach Macleod-Robison ccm pro Analyse	–	200	200	100	100	100	100	100
5 *	Titration nach Macleod-Robison N/200 Thio Differenz in ccm	–	1,72	3,05	2,13	2,53	2,90	3,12	3,04

* Berechnung der Reduktion: ccm N/200 Thio-Differenz (Leerwert-Analysenwert) x 0,4504 ≙ mg Hexosen Reduktion

Beispiel: I Stdn.-Hydrolyse

200 cmm neutraler Hydrolysenlösung ≙ 100 cmm saurer Hydrolysenlösung
100 cmm saurer Hydrolysenlösung ≙ 1,72 x 0,4504 mg Hexosen-Red.
100 ccm saurer Hydrolysenlösung ≙ 1,72 x 0,4504 x 1000 mg Hex. Red. = mg%
= 770 mg% Hexosen-Reduktion

Ergebnisse siehe Tabelle 5

F. Auswertung der Meßergebnisse.

1) Freie Galaktose im Gegensatz zur Mannose sofort nach Hydrolysenbeginn nachweisbar.

Freie Galaktose tritt sofort nach Hydrolysenbeginn auf. Nach vier Stunden sind 89% der Galaktosidbindungen gespalten. Freie Mannose ist erst nach einer Stunde nachweisbar. Nach vier Stunden sind 59% der Mannose des Polysaccharides als freie Mannosen nachweisbar (s.Tabelle 4).

2) Reduktion aller spaltbaren Saccharide in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Reduktion der Summe aller spaltbaren Bruchstücke zu verschiedenen Zeiten (errechnet durch Subtraktion der chromatographisch gemessenen Monosaccharide von der titrimetisch gemessenen Reduktion der Hydrolyse ausgedrückt als Hexose) steigt bis zum Dreistundenwert an und braucht zu ihrem Abfall über 5 Stunden (s.Tabelle 5, und Abb. 2).

3) Bevorzugte Spaltung der α 1-6 Galaktosidbindung im Galaktomannan.

Um die Zahl der gespaltenen Galaktosidbindungen der beiden Bindungsarten zu beurteilen, muß man die Anzahl der gespaltenen Galaktosidbindungen während des ganzen Hydrolysenverlaufs mit der Anzahl der gespaltenen Mannosidbindungen vergleichen. Dies ist nicht durch einen direkten Vergleich der als Monosaccharid freigesetzten Galaktose mit der freien Mannose möglich, da nicht die Menge der freien Mannose, sondern die Reduktion aller Mannosealdehyde der Hydrolysenlösungen der Anzahl der gespaltenen β 1-4 Mannosidbindungen entspricht. Diese Reduktion aller Mannosealdehyde der Hydrolysenlösung wird von mir "Mannosealdehyd-Reduktion" genannt.

Die Berechnung der "Mannosealdehyd-Reduktion" beim Galaktomannan ist einfach, da außer freier Mannose und Galaktose bei der Hydrolyse nur Di- und Oligosaccharide mit reduzierender Mannosealdehydgruppe vorkommen können. Subtrahiert man von der Gesamtreduktion (Tabelle 5) die Reduktion der freien Galaktose (Tabelle 4), so erhält man diese Größe (Tabelle 5, Lfd.Nr.3). Sie ist zur Zeit eine Stunde mit 0,33 g% um 25% kleiner als die Konzentration an freier Galaktose, die nach Tabelle 4 zur gleichen Zeit 0,444 g% beträgt.

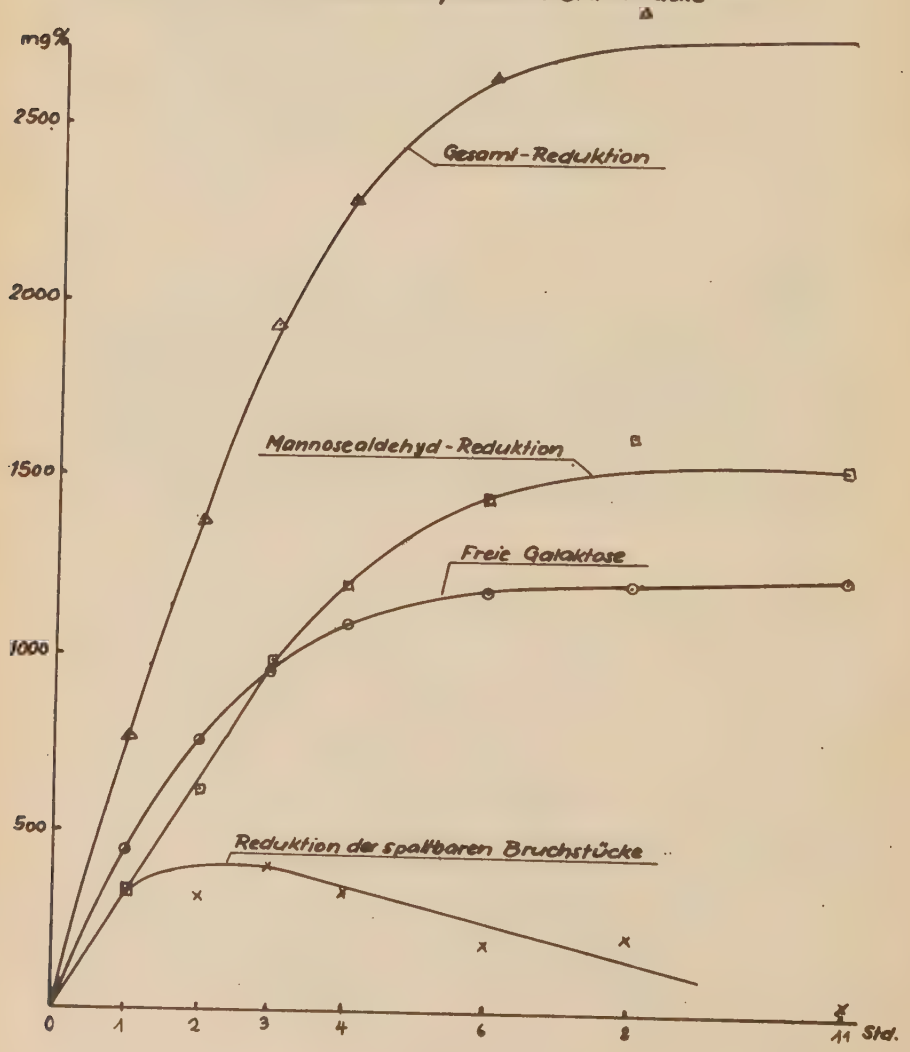
Tabelle 5

Lfd. Nr.		Zeit in Stunden						
		1	2	3	4	6	8	11
1	Gesamtreduktion ausgedrückt in g% Hexose	0,77	1,38	1,92	2,28	2,62	2,81	2,74
2	Reduktion der spaltbaren Bruchstücke ausgedr. in g% Hexose	0,33	0,32	0,40	0,33	0,18	0,21	0,03
3	Mannosealdehyd - Reduktion ausgedrückt als g% Mannose	0,33	0,62	0,98	1,20	1,44	1,62	1,53

Verlauf der Galaktomannanhydrolyse

Abb. 2

Verlauf der Spaltung von Galaktosid- und Mannosidbindungen, Vermehrung und Abnahme der spaltbaren Bruchstücke



4. Zusammenhänge zwischen optischer Drehung und Öffnung der Bindungen im Galaktomannan.

a) Berechnung der molaren Drehung von β 1→4 mannosidisch gebundener Mannose.

Während der Hydrolyse des Polysaccharides ändert sich die optische Drehung der Lösungen (Tabelle 4,S.29) durch Spaltung glykosidischer Bindungen. Der molare Drehungsbeitrag α 1→6 gebundener D-Galaktose wurde von French (14) aus den molaren Drehungen von verschiedenen Oligosacchariden, die diese Bindungen enthalten, errechnet. Es ergibt sich ein mittlerer molarer Drehungsbeitrag $[M]_D^{20}$ von abgerundet 39 500.

Dividiert man diesen molaren Drehungsbeitrag durch den Molekulargewichtsbeitrag, so erhält man definitionsgemäß den spezifischen Drehungsbeitrag der α 1→6 glykosidisch gebundenen D-Galaktose.

$[\alpha]_D^{20}$ α 1→6 gebundener D-Galaktose = 39500:162=243,8°

Die in Lösung befindlichen α 1→6 galaktosidisch gebundenen D-Galaktosen mit spez. Drehungsbeitrag + 243,8° ergeben nach Totalhydrolyse Galaktose mit spez. Drehung von $[\alpha]_D^{20}$ +80,2°. Diese Differenz in der optischen Drehung zwischen α 1→6 gebundener Galaktose und freier Galaktose ist gültig für das Freiwerden von 111,1% D-Galaktose aus ihrer galaktosidischen Bindung, d.h. sie betrifft äquimolare Mengen beider, gebundener und freier Galaktose.

Der Drehungsbeitrag von 90 g% α 1→6 gebundener D-Galaktose wurde aus dem spez. Drehungsbeitrag für 100 g% wie folgt berechnet:

$$243 : 100 = x : 90$$
$$x = + 219,4^\circ$$

Der Drehungsänderungsbeitrag für die Freisetzung von 100 g% D-Galaktose aus α 1→6 galaktosidischer Bindung beträgt somit

$$219{,}4^{o} - 80{,}2^{o} = + 139{,}2^{o}$$

Die Änderung der optischen Drehung der Galaktomannanhydrolyse setzt sich aber aus zwei Drehungsänderungsbeiträgen zusammen, wovon der eine entsteht durch die Spaltung der Galaktosidbindungen, der andere durch die Spaltung der Mannosidbindungen.

Der noch unbekannten Drehungsänderungsbeitrag für die Freisetzung von 100 g% D-Mannose aus 90 g% β 1→4 mannosidisch gebundener Mannose wird im folgenden aus der Galaktomannanhydrolyse berechnet. Die Gleichung zur Berechnung des stöchiometrischen Drehungsänderungsbeitrages beim Übergang von 90g% β 1→4 Mannosid in 100 g% Mannose nach Mutarotation lautet für die Galaktomannanhydrolyse in Worten:

Drehungsänderung hervorgerufen durch D-Galaktosefreisetzung in der Zeit 0 bis t	+	Drehungsänderung hervorgerufen durch D-Mannosealdehyd-freisetzung in der Zeit von 0 bis t	= gesamte Drehungsänderung in der Zeit von 0 bis t

Erklärung der in den folgenden Formeln verwendeten Abkürzungen:

Opt.Drehung t = Optische Drehung der Hydrolysenlösung im 10 cm Rohr zur Zeit t

Opt.Drehung 0 = Optische Drehung der Hydrolysendrehung im 10 cm Rohr vor Hydrolysenbeginn

C_t Gal. = Konzentration der freien Galaktose in g% zur Zeit t

C_t Man. = Konzentration der "Mannosealdehyde" in g% zur Zeit t = Mannosealdehyd-Reduktion in g%

$[\Delta\alpha]_D^{20}$ Gal. = Drehungsänderung bei Freisetzung von 100 g% Galaktose aus α 1→6 Galaktosidbindungen (bezogen auf 10 cm Rohr)

$[\Delta\alpha]_D^{20}$ Man. = Drehungsänderung bei Freisetzung von 100 g% Mannosealdehyden aus β 1→4 Mannosidbindungen (bezogen auf 10cm Rohr)

Somit lautet die oben in Worten gegebene Gleichung:

$$C_t\,Gal \times \frac{[\Delta\alpha]_D^{20}\,Gal}{100} + C_t\,Man \times \frac{[\Delta\alpha]_D^{20}\,Man}{100} = Opt.\,Drehung\,0 - Opt.\,Drehg._t$$

$$C_t\,Man \times \frac{[\Delta\alpha]_D^{20}\,Man}{100} = Opt.\,Drehg.\,0 - Opt.\,Drehg._t - C_t\,Gal \times \frac{[\Delta\alpha]_D^{20}\,Gal}{100}$$

$$[\Delta\alpha]_D^{20}\,Man = \frac{100(Opt.\,Drehg.\,0 - Opt.\,Drehg.\,t) - C_t\,Gal \times [\Delta\alpha]_D^{20}\,Gal}{C_t\,Man}$$

Die zugehörigen Meßwerte der Hydrolyse sind:

Opt.Drehung 0 Stdn. = 2,32° Errechnet aus den
Opt.Drehung 11 " = 1,22° Werten der opt.Drehung
Tabelle 4

$C_{11\ Stdn.}^{Gal.}$ = 1,22 g% aus Tabelle 4

$C_{11\ Stdn.}^{Man.}$ = 1,53 g% " " 5

$[\Delta\alpha]_D^{20}\,Gal.$ = 139,2 Seite 34

Sie ergeben eingesetzt in die obige Gleichung

$$[\Delta\alpha]_D^{20}\,Man = \frac{100(2,32-1,22)-1,217 \times 139,2}{1,53}$$

$$[\Delta\alpha]_D^{20}\,Man = -\,38,8^\circ$$

$-\,38,8^\circ$ beträgt die Drehungsänderung bei Freisetzung von entweder 100 g% Mannose oder der entsprechenden Anzahl von Mannosealdehyden aus 90 g% β1→4 Mannosidbindungen.

Der spez. Drehungsänderungsbeitrag für 100 g% β1→4 gebundene Mannose wird wie folgt berechnet:

$$X : 100 = -\,38,8 : 90$$
$$X = -\,43,1^\circ$$

Der molare Drehungsbeitrag von β1→4 gebundener D-Mannose errechnet sich nun als Summe von

1. Molarer Bindungsbeitrag = - 43,1 x 162 = - 6984
2. Molare Drehung der Mannose = 14,5 x 180 = 2610
   - 4374

Die molare Drehung von β1→4 mannosidisch gebundener Mannose beträgt somit - 4374.

b) Berechnung der spezifischen Drehung des Mannose-Di- und Trisaccharides.

Aus den molaren Drehungen der freien und der gebundenen Mannose ist es möglich, die Molare und spezifische Drehung des Mannosedisaccharides und des Mannosetrisaccharides zu berechnen und mit den in der Literatur angegebenen Drehungen zu vergleichen.

Mannosedisaccharid		
4 -β-D-Mannosido-Mannose:	$[M]_D^{20}$	$[\alpha]_D^{20}$
Theoretisch: + 14,5x180+ -4374=	-1764	-5,16°
Nach Literaturangaben von :		
1. Henderson (3)		-9,0 °
2. Henderson (3)		-4,4°
3. Courtois (11)		-4,2°
4. Whistler Durso (15)		-2,2°

Der theoretische Wert der spez. Drehung stimmt bei dem Mannosedisaccharid relativ gut mit den Literaturangaben überein.

Mannosetrisaccharid		
4 -β-D-Mannosido- 4-β-D-Mannosido-Mannose		
Theoretisch:+14,5x180+2x -4374=	-6138	-12,2°
Nach Literaturangaben von:		
1. Henderson (3)		-16,0°
2. Henderson (3)		-22,0°
3. Whistler Smith (17)		-23,3°
4. Aspinard-Rashbrook (18)		-20,2°

Die Werte 1-4 können sich möglicherweise aus verschiedenen Gleichgewichten zwischen α und β Form der Trisaccharide je nach Bedingungen ergeben, wie folgende Zahlen zeigen

100% α - Form der reduzierenden Gruppe ergäbe ein Trisaccharid mit $[\alpha]_D^{20} = -6,7^\circ$

[α Mannose = $[\alpha]_D^{20}$ + 29,9° (16) als Berechnungsgrundlage]

100% β - Form der reduzierenden Gruppe ergäbe ein Trisaccharid mit $[\alpha]_D^{20} = -23,1^\circ$

[β Mannose = $[\alpha]_D^{20}$ - 16° (16) als Berechnungsgrundlage]

c) Rechnerische Erfassung der Drehungsänderung während der Hydrolyse aus Art und Anzahl der gespaltenen Bindungen.

Es ist möglich, da der Betrag der spez. Drehungsänderung der β1→4 Mannosidbindungen → Mannose nun errechnet worden ist, die ~~die~~ Drehungsänderung für die Zeitabschnitte O bis t der Hydrolyse zu berechnen.

Subtrahiert man für verschiedene Zeiten t die Drehungsänderung, welche die Hydrolyse vom Zeitpunkt O bis t durch Öffnen der β1→4 Mannosidischen und der α1-6 Galaktosidischen Bindungen erfahren hat, von der Anfangsdrehung der Hydrolyse, so muß man, sofern keine weiteren andersartigen Bindungen vorlagen, jeweils den gemessenen Wert der optischen Drehung der Hydrolysenlösung zur Zeit t erhalten.
Es gilt somit die Beziehung:

$$\text{Opt.Drehung } t = \text{Opt.Drehung } O - \left[C_t\,Gal \times \frac{(\Delta\alpha)_D^{20}\,Gal}{100} + C_t\,Man \times \frac{[\Delta\alpha]_D^{20}\,Man}{100}\right]$$

Zugehörige Meßwerte der Hydrolyse:
Opt.Drehung O=2,32° Errechnet aus opt.Drehungen Tabelle 4

C_t Gal. = g% Galaktose aus Tabelle 4

C_t Man. = g% Mannosealdehyd-Reduktion aus Tabelle 5

$[\Delta\alpha]_D^{20} = 90\%$ α 1→6 Galaktosid → 100% Galaktose =+130,2° s.Seite 34

$[\Delta\alpha]_D^{20} = 90\%$ β 1→4 Mannosid → 100%Mannose =- 38,8° s.Seite 35

Tabelle 6

Lfd. Nr.		Zeit in Stunden						
		1	2	3	4	6	8	11
1	Drehungsänderungsbeitrag Galaktose	0,616°	1,058°	1,315°	1,505°	1,634°	1,653°	1,684°
2	Drehungsänderungsbeitrag Mannose	-0,128°	-0,240°	-0,300°	-0,466°	-0,559°	-0,619°	-0,594°
3	Opt. Drehg. d. Hydrolysenlösung Errechnet	1,83°	1,58°	1,39°	1,28°	1,24°	1,30°	1,22°
4	Opt. Drehg. d. Hydrolysenlösung Gemessen *	1,74°	1,48°	1,28°	1,28°	1,20°	1,24°	1,22°

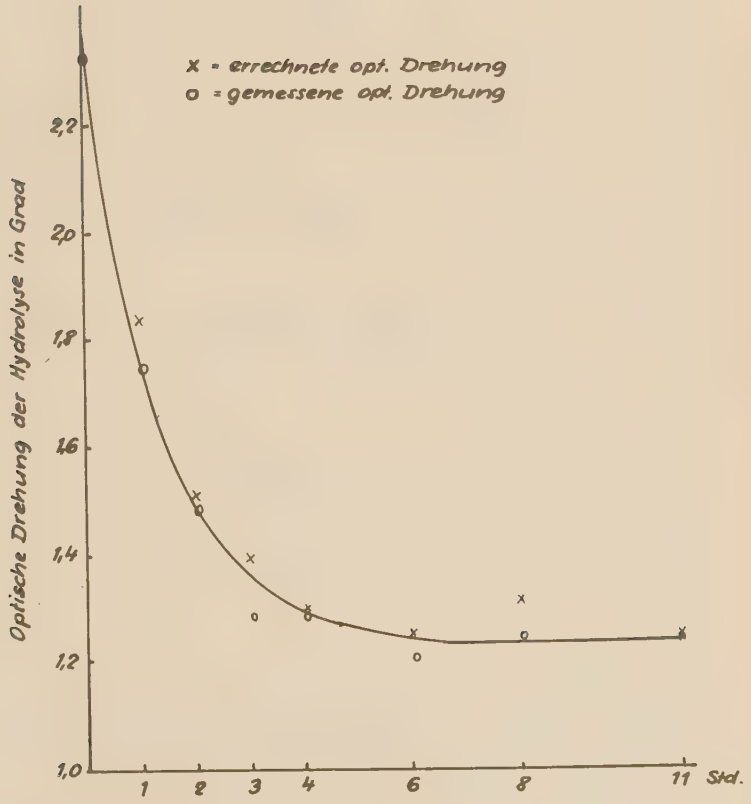
+) Wert liegt zu hoch (Fehlerursache zu hoher Titrationswert der 8 Stdn.-Hydrolyse Tabelle 5)

*) Die Optischen Drehungen der Hydrolysenlösungen wurden im 5 cm Rohr gemessen (Tabelle 4) für den Vergleich mit den errechneten Werten in der vorausgehenden Tabelle auf Drehung im 10 cm Rohr umgerechnet.
Graphische Darstellung siehe folgende Abbildung, Seite 38.

Die errechneten Werte der optischen Drehung der Hydrolysenlösungen stimmen weitgehend mit den gemessenen Werten überein.

Änderung der optischen Drehung bei fortschreitender Hydrolyse

Abb. 3



5) Quantitative Photometrierung der Oligosaccharidzonen in Abhängigkeit von der Zeit nach Anfärbung direkt auf dem Papier.

Da bei der Untersuchung des Hydrolysenverlaufs zu verschiedenen Zeiten die Eluierungsmethode, nach der bisher gearbeitet wurde, wegen zu geringer Konzentration der Di- Tri- und Oligosaccharide (deren Konzentration im Verlauf der Hydrolyse erst ansteigt, dann aber immer geringer wird), nicht mehr ausreicht,* wurde im Folgenden versucht, eine quantitative Photometrierung der Oligosaccharidzonen nach Anfärbung direkt auf dem Papier zu erreichen.

a) Methode für besonders kleine Substanzmengen. Je 20 cmm der neutralisierten Hydrolysenlösungen** wurden auf 3 cm breite und 60 cm lange Chromatographiestreifen Schleicher & Schüll 2043b mit der Konstriktionspipette aufgetragen (je Streifen eine Startstelle mit 2x10 cmm). Die Auftragung muß so vorgenommen werden, daß im Start die Strecken für jeweils 20 cmm alle gleich lang sind, so daß innerhalb der Startlinie überall die gleiche Konzentration vorhanden ist. Damit wird auch die Breite der Auftragung stets gleich. Rechts und links der Auftragung bleibt eine freie Zone von 2 mm.

* Bei der Hydrolyse der Zone V waren nach 4 Stunden die Farbkonzentrationen der Zonen III, IV und V (nach Anfärbung) so gering, daß sie mit dem Auge nicht mehr sichtbar waren und deshalb zur Elution nicht mehr ausgeschnitten werden konnten. (S.Tabelle 3, S.21)

** Bei Messung der Extinktion der im Start verbleibenden Substanzen müssen die Hydrolysenlösungen vorher neutralisiert werden, da sonst der Start beim Trocknen der Analysenlösungen durch Erhöhung der Säurekonzentration so verändert wird, daß er mit dem Anilinphthalatreagenz wie ein reduzierender Zucker anfärbbar wird. Man kann dies zeigen, wenn man reine Säure aufträgt und die Auftragsstelle dann anfärbt.

Es wurde in maximal gesättigten Batteriekästen mit Butanol-Pyridin-Wasser chromatographiert. Laufzeit der Chromatogramme nur 30 Stunden, da die Zonen, die ausgemessen werden sollten und ein Leerwert (saccharidfreie Strecke) aus meßtechnischen Gründen auf einer Strecke von weniger als 16 cm liegen sollen.

Die Anfärbung der Chromatographiestreifen wurde in gleicher Weise wie bei der Elutionsmethode (Seite 9 und 10) vorgenommen.

Es wurden die Extinktionen der Saccharidzonen mit dem Chromatogrammansatz PMQ II des Zeiss Spektralphotometers bei der Wellenlänge 390 mμ ohne den Streifen transparent zu machen, unmittelbar gemessen. In einem Diagramm wurde die Extinktion gegen die Laufweite aufgetragen. Die Flächen der Diagrammzonen wurden planimetriert (s.Abb.Seite 42).

Bei der direkten Photometrierung der angefärbten Oligosaccharide auf dem Papier waren die aufgetragenen Oligosaccharidmengen der Zonen III und IV bis maximal 30 γ (Disaccharid), der Zone V bis maximal 45 γ (Trisaccharid) den planimetrierten Flächen proportional.

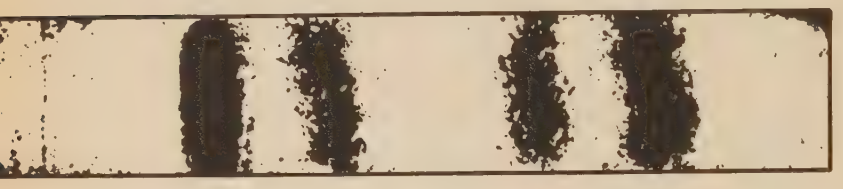
Wegen der Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes konnte somit auf die Aufstellung von Eichkurven verzichtet werden.

b) Eichung durch Vergleich mit Elutionsmethode. Zur Eichung wurden auf 3 cm breite Chromatographiestreifen je 20 cmm einer neutralisierten Hydrolysenlösung (2 Stdn.-Hydrolysenlösung in n/5 H_2SO_4) aufgetragen. Die Saccharide wurden wie oben beschrieben getrennt, angefärbt und ausgewertet. (Diagramm, Planimetrierung der Flächen der einzelnen Diagrammzonen). Ergebnisse Tabelle 7.

Photometrische Auswertung eines angefärbten Chromatogrammstreifens der Oligosaccharide im Durchlicht

Abb. 4

Fotokopie des unten ausgewerteten Chromatogramm - streifens. (Die Schwärzung der Zonen entspricht nicht der Färbung des Originales)



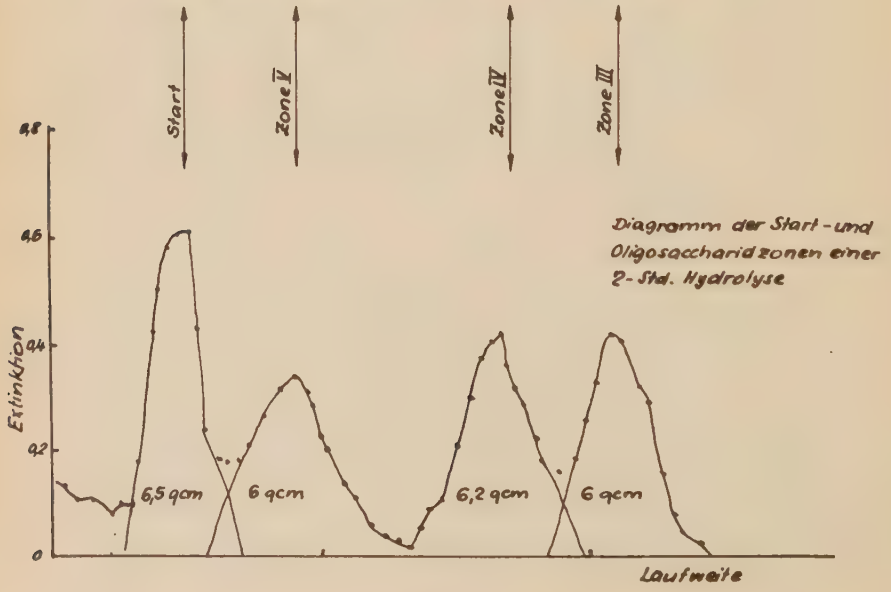


Diagramm der Start - und Oligosaccharidzonen einer 2-Std. Hydrolyse

Anschließend wurden die gleichen angefärbten Oligosaccharidzonen und je Chromatogrammstreifen ein Leerwert gleicher Größe eluiert. (Ergebnis Tabelle 7, Lfd.Nr.1). Aus den Extinktionen der eluierten Saccharidzonen wurden die Saccharidkonzentrationen (Tabelle 7, Lfd.Nr.5) mit Hilfe der zugehörigen Extinktionseinheiten für 1 g% Hexose (Tabelle 7, Lfd.Nr.4) berechnet.

Zusätzlich enthält die Tabelle 7 noch die Werte der mittleren Fehler der Einzelmessungen (Extinktion (Tabelle 7, Lfd.Nr. 2), Fläche (Tabelle 7, Lfd.Nr.7)) und den Prozentsatz des entsprechenden Fehlers (Tabelle 7, Lfd.Nr. 3 und 8).

Aus den mit der Elutionsmethode berechneten mittleren Saccharidkonzentrationen jeder Zone (Tabelle 7, Lfd.Nr. 5) und den entsprechenden Flächen (Tabelle 7, Lfd.Nr. 6) wurden die Flächen jeder Zone, die einem g% Hexose, gebunden als Disaccharid (Zone III und IV) oder Trisaccharid (Zone V), entspricht wie folgt berechnet:

Beispiel Zone III:

$$x : 1000 \text{ mg\%} = 4{,}1 \text{ cm}^2 : 157 \text{ mg\%}$$

$$x = 26{,}1 \text{ cm}^2$$

Ergebnisse in Tabelle 7, Lfd.Nr.9.

Eichung durch Vergleich mit Elutionsmethode
Berechnung der mittleren Fehler

Tabelle 7

Lfd. Nr.		Zone III	Zone IV	Zone V	Start
1	Extinktion Mittelwerte von 6 Chromatographiestreifen	0,037	0,048	0,047	0,066
2	mittlerer Fehler der Einzelmessung $m=\sqrt{\frac{\Sigma(d^2)}{n-1}}$	±0,0014	±0,0039	±0,0042	±0,0085
3	mittlerer Fehler = % der entsprechenden Extinktion	± 3,8%	± 8,7%	± 8,9%	± 13%
4	Extinktion für 1g% Hexose gebunden als Disaccharid (Zone III und IV) oder Trisaccharid (Zone V)	0,236	0,225	0,154	
5	mg% Hexose gebunden im Saccharid der Zonen	157	200	305	
6	qcm planimetrierte Flächen Mittelwerte von 7 Chromatographiestreifen	4,1	4,9	5,2	7,86
7	mittlerer Fehler der Einzelmessung $m=\sqrt{\frac{\Sigma(d^2)}{n-1}}$	± 0,49	± 0,49	± 0,59	± 0,65
8	mittlerer Fehler = % der entsprechenden Fläche	6,9%	4,1%	11,3%	8,2%
9	1g% Hexose gebunden als Disaccharid (Zone III und IV) oder Trisaccharid (Zone V) entspr. qcm der planimetrierten Fläche	26,1	24,5	17,0	

c) Messung der Oligosaccharide
während des Hydrolysenverlaufes.

Von jedem für die Oligosaccharidmessung bestimmten Chromatographiestreifen wird ein Diagramm der Startzone und der Oligosaccharidablagerungen wie Seite 39 und 40 beschrieben aufgenommen. Die Mittelwerte der Flächen aus acht Chromatogrammen je Hydrolysenzeit sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Flächen der Diagramme der Oligosaccharidzonen

Tabelle 8

Lfd. Nr.		Zeit in Stunden					
		1	2	3	4	6	8
1	Zone III qcm	1,0	3,3	5,3	6,2	4,0	1,6
2	Zone IV qcm	1,4	3,2	3,6	3,8	1,8	0,9
3	Zone V qcm	1,6	3,9	4,7	4,5	1,3	0
4	Start qcm	5,0	6,3	4,9	3,4	0	0

Berechnung der Saccharidkonzentration der planimetrierten Flächen der Oligosaccharidiagramme der Zonen III, IV und V der Galaktomannan-Hydrolysen:

In Tabelle 7, Lfd.Nr. 9 sind die Flächen aufgeführt, die 1 g% Hexose gebunden im Di- oder Trisaccharid des Diagrammes der Oligosaccharidzone entsprechen. Mit Hilfe dieser Flächen wurden die Saccharidkonzentrationen der Zonen III, IV und V aus den Flächen der Tabelle 8 berechnet und in Tabelle 9 eingetragen.

6) Berechnung der Konzentrations- und mittleren Molekülgrößenänderung der Saccharide der Startzone in Abhängigkeit von der Zeit.

Die Konzentration der Saccharide der Startzone kann nur als Differenz ermittelt werden, da diese Zone ein Gemisch von Oligosaccahriden enthält, deren Größe und Zusammensetzung sich während des Hydrolysenverlaufes ständig ändert.

Berechnung der Saccharidkonzentration der Startzone:

Beispiel: 1 Stdn.-Hydrolyse

Hexosen der Totalhydrolyse aus Tabelle 4, d.h. Galaktose + Mannose der 11 Stdn.-Hydrolyse = 2 707 mg%

Summe aller Hexosen, die enthalten sind in den Sacchariden der Zonen I, II, III, IV und V aus Tabelle 9, Lfd.Nr.4 z.Zt.1Std.= 633 mg%

Die Konzentration der Hexosen gebunden in den Sacchariden der Startzone beträgt zur Hydrolysenzeit 1 Stunde:

$$2707 \text{ mg\%} - 633 \text{ mg\%} = 2074 \text{ mg\%}.$$

Die Ergebnisse wurden in Tabelle 9, Lfd.Nr. 5 zusammengestellt.

Berechnung der Mannosealdehydreduktion der Startzone.

Es ist wahrscheinlich, daß auch die Farbintensität der Startzone auf dem Papier ebenso wie die Farbintensität der Di- und Trisaccharide der Anzahl der Mannosealdehydgruppen weitgehend entspricht. Unter dieser Annahme wurde aus den Flächen der Di- und Trisaccharide der Tabelle 7, Lfd.Nr.9 ein Mittelwert der Fläche errechnet, die 1 g% freier Mannose entspricht.

Beispiel:

1 g% Hexose gebunden im Disaccharid der Zone III entspricht einer Fläche von 26,1 qcm

1 g% Mannose hat doppelt so viele Aldehydgruppen

1 g% Mannose entspricht daher einer Fläche von
26,1 x 2 = 52,2 qcm.

Zusammenstellung:

Zone III	Disaccharid	26,1 x 2	= 52,2 qcm
Zone IV	"	24,5 x 2	= 49,0 qcm
Zone V	Trisaccharid	17,0 x 3	= 51,0 qcm
		Mittelwert:	50,7 qcm

1 g% Mannose entspricht einer Fläche von 50,7 qcm.

Aus den Flächen der Startzone (Tabelle 8) wurde die Reduktion an Mannosealdehyden wie folgt berechnet:

1 Stdn.-Hydrolyse
x mg% : 5 qcm = 1000 mg% : 50,7 qcm
x = 98,6 mg%

Die Ergebnisse wurden in Tabelle 9, Lfd.Nr. 6 (Mannosealdehydreduktion) der Startzone)zusammengestellt.

Berechnung der Zahl der Hexosen, die im Mittel das Saccharid der Startzone während des Hydrolysenverlaufes bilden.

Dividiert man die mg% Hexosen gebunden im Saccharid der Startzone (Tabelle 9, Lfd.Nr. 5) durch die mg% Mannosealdehydreduktion (Tabelle 9, Lfd.Nr. 6) der gleichen Hydrolysenzeit, so erhält man die Anzahl der Hexosen, die im Mittel das Saccharid der Startzone bilden.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 9, Lfd.Nr. 7 zusammengestellt. Man kann auf diese Weise die Saccharide im Start bis zu ihrem Rückgang auf 10% der Ausgangsmenge noch gut charakterisieren.

Konzentration der Hexosen geb. im Di-, Trisaccharid und der Startzone. Mitth. Molekülgröße der Saccharide der Startzone

Tabelle 9

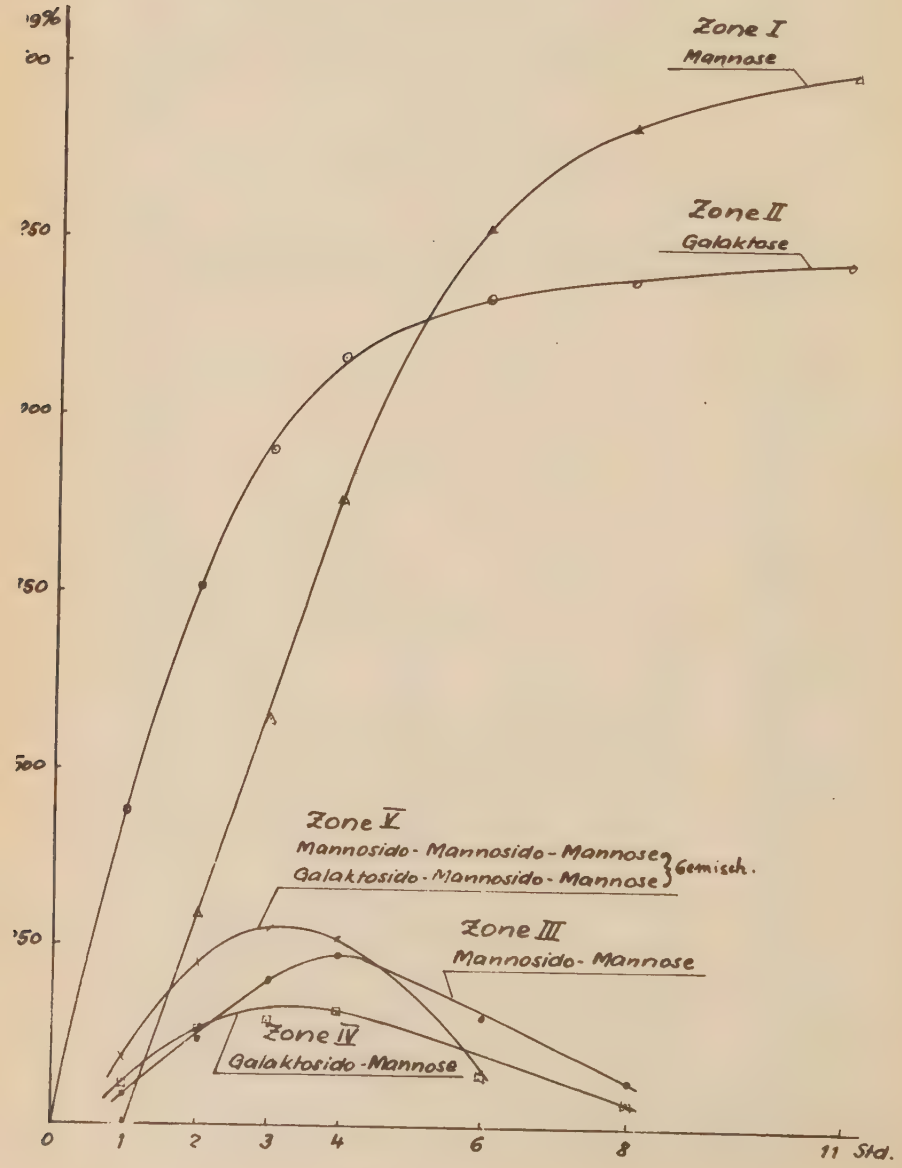
Lfd. Nr.		Zeit in Stunden						
		1	2	3	4	6	8	11
1	mg% Mannose gebunden im Saccharid der Zone III (Mannosido-Mannose)	38	126	203	237	153	61	0
2	mg% Hexose gebunden im Saccharid der Zone IV (Galaktosido-Mannose)	57	131	147	155	73	37	0
3	mg% Hexose gebunden im Saccharid der Zone V (Trisaccharidgemisch)	94	229	276	265	76	0	0
4	mg% Summe der Hexosen frei und gebunden der Saccharide der Zonen I bis V (Werte der Zone I und II aus Tabelle 4)	633	1543	2142	2610	2741	2702	2707
5	mg% Hexosen gebunden in den Saccharieden der Startzone	2074	1164	565	97	0	0	0
6	mg% Mannosealdehyd - Reduktion der Startzone	99	124	97	67	0	0	0
7	Hexosen bilden im Mittel das Saccharid der Startzone. (mittlere Molekülgröße)	21	9	6	(2) *	0	0	0

* Wert nicht verwendbar da zu niedrig, kleinstes Saccharid der Startzone ist das Tetrasaccharid

Verlauf der Galaktomannanhydrolyse

Abb. 5

Konzentrationsänderungen der Di- und Trisaccharide im Vergleich zur Freisetzung der beiden Monosaccharide



Zusammenfassung .

1. Die Baarsche Methode zur Anfärbung von Glukose auf Papier wird auf ihre Verwendbarkeit für Galaktose und Mannose geprüft und verbessert.
2. Es wird gezeigt, daß diese verbesserte Methode bei Oligosacchariden aus Mannose und Galaktose nur das aldehydische Ende anfärbt und die Intensität der Färbung für äquimolare Mengen von Mono-, Di- und Trisaccharid dieselbe ist.
3. Die Färbung ist der Anzahl der Aldehydgruppen direkt proportional, d.h. sie folgt für Monnosaccharide bis 20 γ , für Disaccharide bis 30 γ und für Trisaccharide bis 45 γ pro Chromatogramm dem Lambert-Beerschen Gesetz.
4. Die Gesetzmäßigkeiten zwischen der Anzahl der Aldehydgruppen und der Farbintensität gilt sowohl für die eluierte Farbe, wie auch für die Farbmessung auf Papier im Durchlicht.
5. Mit dieser Methode wird der zeitliche Verlauf der Säurehydrolyse von Galaktomannan untersucht und gezeigt:
   a.) daß die D- Galaktoseabspaltung aus ihrer endständigen α 1 - 6 Bindung absolut rascher verläuft als die Öffnung der β 1 - 4 Bindungen der Mannosekette,
   b) daß die Zahl der Oligosaccharide schon während des ersten Drittels der Säurehydrolyse ihr Maximum erreicht, während das Maximum beim Disaccharid Mannosido-Mannose deutlich später auftritt und praktisch mit dem Verschwinden von großen Hydrolysenspaltstücken(größer als Trisaccharid) zusammenfällt.

6. Die während der Hydrolyse beobachtete optische Drehungsänderung wird mit der Öffnung der beiden verschiedenen Bindungsarten im Galaktomannan in Beziehung gesetzt.
a) Es wird der molare Drehungsbeitrag der β 1-4 mannosidisch gebundenen Mannose aus der Hydrolyse errechnet und mit den sehr schwankenden Werten der optischen Drehungen der entsprechenden Oligosaccharide in der Literatur verglichen.
b) Aus der Zahl der geöffneten Mannosid- und Galaktosidbindungen und der für Freisetzung von Galaktose aus α 1-6 Galaktosidbindungen und Mannose aus β 1-4 Mannosidbindungen berechneten Drehungsbeiträge wird für jeden Zeitpunkt der Hydrolyse die optische Drehung derselben berechnet. Die sich ergebende Kurve stimmt mit der gemessenen gut überein.

Literaturverzeichnis

1.	F. May, H. Weinland	Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 305, 75 (1956)
2.	F. May, A.S. Schulz,	Z.Biol. 97, 201 (1936)
3.	M.E.Henderson,L.Hough, T.J.Painter	J.chem.Soc.(London) (1958) 3519
4.	S. Baar	Biochem.J. 58, 175 (1954)
5.	J.W. Date	Scandinav.J.Clin.E.Lab. Investigation 10,149 (1958)
6.	C.M. Wilson	Analytic.Chem. 31,1199 (1959)
7.	Cordes Jencks	J.Amer.chem.Soc. 84,832 (1961)
8.	A.W. van der Haar	Anleitung zum Nachweis, zur Trennung und Bestimmung der Monosaccharide und Aldehydsäuren, Verlag Gebr. Borntraeger Berlin (1920)
9.	E.B. Larson, Smith	J.Amer.chem.Soc. 77, 429 (1955)
10.	J.E. Courtois, C.Anagnostopulus, F. Petek	Bull.Soc.Chim.Biol. 40,1277 (1958)
11.	J.E. Courtois, F. Petek, T.Kada	Bull.Soc.Chim.Biol. 40,2031 (1958)
12.	M. Geldmacher-Mallinckrodt, H. Weinland	Hoppe-Seyler's Z.physiol.Chem. 292, 65 (1953)
13.	M. Macleod, R. Robison	Biochem.J. 23, 517 (1929)
14.	Dexter, French	Advances in Carbohydrate Chemistry Volume 9, Verlag Academic Press New York
15.	R.L.Whistler, D.F.Durso	J.Amer.chem.Soc. 73, 4189 (1951)
16.	Tollens-Elsner	Kurzes Handbuch der Kohlenhydrate (1935) Verlag Johann Ambrosius Barth Leipzig
17.	Whistler, Smith	J.Amer.chem.Soc. 74, 3795 (1952)
18.	Aspinall, Rashbrook, Kessler	J.chem.Soc.(London) (1958) 215

Herrn Professor Dr. Dr. F. M a y danke ich für die Überlassung des Themas und für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Frau Privatdozent Dr. Dr. habil H. W e i n l a n d danke ich für ihre stets große Hilfsbereitschaft und wertvollen Hinweise und Ratschläge.

L e b e n s l a u f

Als Sohn des praktischen Arztes Dr. Walter Mittendorf und seiner Ehefrau Elisabeth Mittendorf, geb.Köhler, wurde ich Bernd Mittendorf am 27.6.1932 in Bad Sachsa geboren.

Dort besuchte ich die Volksschule und anschließend die Oberschule.

Nach der Reifeprüfung begann ich im Sommersemester 1954 mit dem Medizinstudium in Erlangen.Studierte drei Semester in Göttingen, legte dann nach dem 5. Semester in Erlangen die ärztliche Vorprüfung ab.Ich begann dann im Winterhalbjahr 1956 das Klinische Studium in Erlangen, daß ich im September 1960 mit Ablegung des Staatsexamens beendete.Anschließend arbeitete ich als Wissenschaftliche Hilfskraft und als Medizinalassistent im Physiologisch- chemischen Institut der Universität Erlangen.

Erlangen, 25. Juli 1962

GEDRUCKT BEI LUDWIG MÜLLER ERLANGEN